

51

Int. Cl. 2:

C 12 C 7/00

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



DE 27 55 067 A 1

11

Offenlegungsschrift 27 55 067

21

Aktenzeichen: P 27 55 067.0-41

22

Anmeldetag: 10. 12. 77

23

Offenlegungstag: 26. 10. 78

20

Unionspriorität:

42 33 31

11. 12. 76 Japan 148981-76

31. 8. 77 Japan 104524-77

54

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Brauwürze

71

Anmelder: Kirin Beer K.K.; Meiji Seika K.K.; Tokio

74

Vertreter: Reichel, W., Dr.-Ing.; Reichel, W., Dipl.-Ing.; Pat.-Anwälte,
6000 Frankfurt

72

Erfinder: Yoshioka, Kazuo; Hashimoto, Naoki; Takasaki, Gunma;
Hidaka, Hidemasa, Yokohama; Oneda, Toru, Kawasaki;
Kanagawa (Japan)

Prüfungsantrag gem. § 28 b PatG ist gestellt

DE 27 55 067 A 1

Patentanwälte
Dr.-Ing. Wilhelm Reichel
Dipl.-Ing. Wolfgang Reichel
6 Frankfurt a. M. 1
Parkstraße 13

8965

2755067

KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA, Tokio, Japan
MEIJI SEIKA KABUSHIKI KAISHA, Tokio, Japan

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Brauwürze durch enzymatische Behandlung eines stärkehaltigen Materials, dadurch gekennzeichnet, daß man

(1) ein stärkehaltiges Material, das Gerste als einen Hauptbestandteil enthält, die einer Gelatinierung unterworfen worden ist, bereitstellt und

(2) auf das stärkehaltige Material zu seiner Verzuckerung eine Amylase einwirken läßt, die durch aerobe Züchtung eines der Gattung *Streptomyces* angehörenden Amylase erzeugenden Microorganismus hergestellt ist und, wenn Stärke verwendet wird, derartige enzymatische Aktivitäten und Eigenschaften aufweist, daß ihr optimaler pH-Wert im Bereich von 4,5 bis 5,0 liegt, der Grenzwert für die Stärkehydrolyse nicht unter 75% der theoretischen Maltose liegt und ein Verhältnis von Glucose zu Maltose, die aus der Stärke erhalten werden, von nicht über 0,06:1, bezogen auf das Gewicht, vorliegt (*Streptomyces*-Amylase).

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das gelatinierte stärkehaltige Material durch Kochen von Gerste sowie von 0 bis 80%, bezogen auf das Gewicht der Gerste, an einem zusätzlichen stärkehaltigen Material außer Gerste herstellt.

809843/0571

2755067

3. Verfahren gemäß Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man das Gelatinieren durch Kochen in Gegenwart eines
verflüssigenden Enzyms unter Herstellung eines gelatinier-
ten und verflüssigten stärkehaltigen Materials durchführt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man das gelatinierte stärkehaltige Material durch
Kochen von Gerste und von 0 bis unter 80%, bezogen auf das
Gewicht der Gerste, an einem ersten weiteren stärkehalti-
gen Material außer Gerste herstellt und die Streptomyces-
Amylase auf das gelatinierte stärkehaltige Material ein-
wirken läßt, während man ein zweites weiteres stärkehalti-
ges Material außer Gerste in einer derartigen Menge, daß
die Summe aus dem ersten und dem zweiten weiteren stärke-
haltigen Material bis 80%, bezogen auf das Gewicht der
Gerste, ausmacht, einer Verflüssigungsbehandlung unter-
wirft, und daß man das verflüssigte zweite weitere stärke-
haltige Material dem gelatinieren stärkehaltigen Material,
auf das die Streptomyces-Amylase einwirkt, unter Fortset-
zung der Verzuckerungsbehandlung zusetzt.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man Gerste und 0 bis 80%, bezogen auf das Gewicht
der Gerste, an einem weiteren stärkehaltigen Material
außer Gerste in einem Extruder gelatiniert.

809843/0571

6. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Gerste und 0 bis weniger als 80%, bezogen auf das
Gewicht der Gerste, an einem ersten weiteren stärkehaltigen
Material außer Gerste in einem Extruder gelatiniert, daß
man Streptomyces-Amylase auf das gelatinierte stärkehalti-
ge Material einwirken läßt, während man ein zweites weite-
res stärkehaltiges Material außer Gerste in einer derarti-
gen Menge, daß die Summe aus dem ersten und zweiten weite-
ren stärkehaltigen Material bis 80%, bezogen auf das Ge-
wicht der Gerste, ausmacht, in Gegenwart eines verflüssi-
genden Enzyms einer Verflüssigungsbehandlung unterwirft,
und daß man das verflüssigte zweite weitere stärkehaltige
Material dem gelatinierten stärkehaltigen Material, auf
das die Streptomyces-Amylase einwirkt, zur Weiterführung
der Verzuckerungsbehandlung zusetzt.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die enzymatische Behandlung dadurch durchführt,
daß man eine Aufschlammung des stärkehaltigen Materials
in Gegenwart der Streptomyces-Amylase erhitzt und die ge-
samte Aufschlammung einer Behandlung bei mindestens zwei
verschiedenen Temperaturen unterwirft.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die enzymatische Behandlung dadurch durchführt,
daß man eine Aufschlammung des stärkehaltigen Materials
in Gegenwart der Streptomyces-Amylase erhitzt und die
Temperatur der Aufschlammung durch Kochen eines Teils der
Aufschlammung und Wiedervereinigen dieses Teils mit der
verbliebenen Aufschlammung erhöht.

2755067

9. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die enzymatische Behandlung in Gegenwart einer
Kombination aus Streptomyces-Amylase und einem Hilfs-
enzym durchführt.

10. Verfahren zur Herstellung von Brauwürze durch enzy-
matische Behandlung eines stärkehaltigen Materials,
dadurch gekennzeichnet,
daß man

(1) ein stärkehaltiges Material, das als einen
Hauptbestandteil Gerste enthält, bereitstellt und

(2) auf das stärkehaltige Material zu seinem ~~Ver-~~ *Abbau*
~~zuckerung~~ eine Amylase und eine Protease einwirken läßt,
wobei die Amylase durch aerobe Züchtung eines der Gattung
Streptomyces angehörenden Amylase erzeugenden Microorganis-
mus hergestellt ist, und wenn Stärke verwendet wird, der-
artige enzymatische Aktivitäten und Eigenschaften aufweist,
daß ihr optimaler pH-Wert im Bereich von 4,5 bis 5,0 liegt,
der Grenzwert für die Stärkehydrolyse nicht unterhalb 75%
der theoretischen Maltose liegt und ein Verhältnis von
Glucose zu Maltose, die aus der Stärke erzeugt werden, von
nicht über 0,06:1, bezogen auf das Gewicht, vorliegt
(Streptomyces-Amylase), und die Protease von einem der
Gattung Aspergillus angehörenden Microorganismus erzeugt
ist (Aspergillus-Protease).

11. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Gerste gelatinierte Gerste verwendet.

12. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Gerste nichtgelatinierte Gerste verwendet.

809843/0571

2755067

13. Verfahren gemäß Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Gerste der Einwirkung der Streptomyces-Amylase
und der Aspergillus-Protease unterwirft, während man ein
weiteres stärkehaltiges Material außer Gerste in einer Menge
von bis 80%, bezogen auf das Gewicht der Gerste, in Gegen-
wart eines verflüssigenden Enzyms einer Verflüssigungsbe-
handlung unterwirft, und daß man das verflüssigte weitere
stärkehaltige Material der Gerste, auf die die Streptomy-
ces-Amylase und die Aspergillus-Protease einwirkt, zur
Fortsetzung der enzymatischen Behandlung zusetzt.

14. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Microorganismus Streptomyceshygroscopicus
ATCC Nr. 21722, Streptomycesviridochromogenes ATCC
Nr. 21724, Streptomycesalbus ATCC Nr. 21725 oder Strepto-
mycestosaensis nov. sp. ATCC Nr. 21723 verwendet.

15. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Aspergillus-Protease mit Hilfe eines der
Gattung Aspergillus angehörenden Microorganismus erzeugt,
der aus der Gruppe Aspergillusoryzae, Aspergillusmellius
und Aspergillusniger ausgewählt ist.

16. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die enzymatische Behandlung dadurch durchführt,
daß man eine Aufschlammung des stärkehaltigen Materials
in Gegenwart der Streptomyces-Amylase und Aspergillus-
Protease erhitzt und die gesamte Aufschlammung einer Be-
handlung bei mindestens zwei verschiedenen Temperaturen
unterwirft.

809843/0571

2755067

17. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die enzymatische Behandlung dadurch durchführt,
daß man eine Aufschlammung des stärkehaltigen Materials
in Gegenwart der Streptomyces-Amylase und der Aspergillus-
Protease erhitzt und die Temperatur der Aufschlammung durch
Kochen eines Teiles der Aufschlammung und Wiedervereinigen
dieses Teils mit der restlichen Aufschlammung erhöht.

18. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die enzymatische Behandlung in Gegenwart einer
Kombination aus der Streptomyces-Amylase, der Aspergillus-
Protease und einem Hilfsenzym durchführt.

19. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Hilfsenzym eine andere Amylase als Streptomy-
ces-Amylase, eine andere Protease als Aspergillus-Protease,
eine Glucanase oder eine Cellulase verwendet.

809843/0671

2755067

KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA, Tokio, Japan
MEIJI SEIKA KABUSHIKI KAISHA, Tokio, Japan

Verfahren zur Herstellung von Brauwürze

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Brauwürze ohne Malz. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Würze, die sich zum Brauen von Bier eignet, durch Verwendung äußerer Enzyme. Bei diesem Verfahren erfolgt eine enzymatische Behandlung von stärkehaltigen Materialien, wie Gerste, wobei vor allem Amylase verwendet wird, die von einem Mikroorganismus der Gattung Streptomyces erzeugt wird (vgl. US-PS 3 804 717).

Bekanntlich wird beim Brauen gehopfte Würze unter Verwendung von Bierhefe der alkoholischen Gärung unterzogen. Die Würze wird hergestellt, indem man Gerstenmalz und nötigenfalls ein weiteres stärkehaltiges Material mit Hilfe einer Gruppe von Enzymen des während des Mälzens erzeugten Malzes einmaischt. Daher erfordert die herkömmliche Erzeugung von Brauwürze im wesentlichen ein sog. Mälzverfahren, bei dem durch Einweichen, Keimen und Darren von Gerste Malz erzeugt wird. Während des Mälzens werden verschiedene Bestandteile der Gerste, wie die Stärke, modifiziert, und es wird eine Gruppe von Enzymen erzeugt, die für das Maischen erforderlich sind.

Während des Maischens werden die im Malz vorhandenen löslichen Materialien und zusätzliches stärkehaltiges Material extrahiert, während die unlöslichen Materialien von den Enzymen des Malzes gelöst und abgebaut werden.

809843/0671

Der Hauptzweck des Mälzens besteht darin, eine Gruppe von Enzymen herzustellen, die für das Maischen erforderlich sind. Dieses Mälzen ist jedoch zeitraubend, erfordert viele Einrichtungen und bedingt eine komplizierte Verfahrenssteuerung.

Deswegen ist die Eliminierung des Mälzens, wobei das Malz durch ungemälzte Gerste und äußere Enzyme ersetzt wird, schon frühzeitig vorgeschlagen worden (US-PS 3 081 172 aus dem Jahre 1963), und seitdem sind viele weitere Versuche in derselben Richtung unternommen worden. Um Bier mit einem ausgezeichneten Aroma zu brauen, ist es erforderlich, Würze herzustellen, deren einzelne Komponenten sich in einem bestimmten Bereich bewegen. Vor allem zum Stärkeabbau, der beim Brauen die wichtigste Rolle spielt, ist es von großer Bedeutung, vergärungsfähige Zucker und Dextrine in bestimmter Konzentration in der Würze während des Maischens zu erzeugen.

Die vergärungsfähigen Zucker sind als Hauptnahrungsquelle für die Bierhefe von Bedeutung. Ein Mangel an diesen Zuckern verhindert ein Fortschreiten der Gärung und führt dadurch zu einem unausgewogenen Geschmack des erhaltenen Biers. Die Dextrine sind für die kolloidalen Eigenschaften und den vollen Geschmack des Bieres von Bedeutung. Eine Steuerung der Bildung von vergärungsfähigen Zuckern und Dextrinen der Würze bis zu einer erwünschten Konzentration je nach dem Typ des zu brauenden Bieres ist daher zum Erhalten eines im Geschmack ausgezeichneten Bieres von großer Bedeutung. Ungemälzte Gerste läßt sich jedoch im Vergleich zu Malz schlecht abbauen, weil die Bildung von Enzymen und die Modifizierung der Stärke in den Gerstekörnern nicht zufriedenstellend verläuft. Der enzymatische Abbau von Gerstenstärke zur Herstellung von Brauwürze ist somit bisher nicht voll erfolgreich gewesen. Wird Malz vollständig durch ungemälzte Gerste und ein äußeres Enzym ersetzt, so ist es

bisher unmöglich gewesen, einen hinreichenden Abbau der Gerstenstärke während des Maischens zu erzielen, wie oben erwähnt, und damit vergärungsfähige Zucker in hinreichender Menge zu erzeugen. Der scheinbare Vergärungsgrad (apparent attenuation limit) von aus Gerste und Enzymen hergestellter Würze ist geringer als derjenige von herkömmlicher Würze aus Malz.

Demzufolge ist es immer noch notwendig, auch beim Maischen von Gerste mit äußeren Enzymen Malz zu verwenden. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise auf Eur. Brew. Conv., Proc., 149 (1971); J. Inst. Brewing, 80, 206(1974); MBAA, Technical Quarterly, 2, 12(1972); Brewers' Digest, July, 56(1969) sowie auf die GB-PS 1 303 644 verwiesen. Das herkömmliche Verfahren zur Würzeerzeugung beim Brauen mit Gerste und äußeren Enzymen verläuft wie folgt. Gerste als Hauptrohmaterial wird in einen Maischbottich zusammen mit Wasser, Malz und einem äußeren Enzym eingebracht. Die Aufschlammung wird hauptsächlich zum Proteinabbau bei einer Temperatur von 45 bis 50 °C gehalten, danach auf 60 bis 65 °C erhitzt und hauptsächlich zur Bildung von vergärungsfähigen Zuckern bei dieser Temperatur gehalten. Das Maischdiagramm ist nicht sonderlich von dem des herkömmlichen Maischens mit Malz verschieden.

Einerseits sind Versuche vorgeschlagen oder durchgeführt worden, solche äußeren Enzyme zu finden, die sich zum Brauen mit Gerste und äußerem Enzym eignen, während andererseits Versuche vorgeschlagen oder durchgeführt wurden, um die Eigenschaften der Gerstenkörner derart zu modifizieren, daß ihre Bestandteile, wie Gerstenstärke, wie die Bestandteile des Malzes leicht abgebaut werden können. Beispielsweise wurde vorgeschlagen, Gerste zur Verflüssigung vorzuerhitzen. In einem derartigen Fall wird die Verzuckerung der verflüssigten Stärke jedoch unter Zusatz von Malz als Quelle für eine β -Amylase durchgeführt, weil die

Vorbehandlung der Gerstenkörner bei hohen Temperaturen die in den Körnern vorhandene latente β -Amylase inaktiviert (vgl. US-PSn 3 712 820, 3 713 840 und 3 719 500).

Ein Versuch zur Herstellung von Brauwürze ohne die Verwendung von Malz durch Kochen von Gerste und einem zusätzlichen stärkehaltigen Material sowie anschließender enzymatischer Behandlung ist bereits bekannt. Da in diesem Falle jedoch Zuckersirup in der dreifachen Menge, bezogen auf die Gerste, zugesetzt wird (vgl. JA-AS 4428/65), kann man dieses Verfahren nicht im strengen Sinne als ein Verfahren zum vollständigen Ersatz von Malz durch Gerste und Enzymen bezeichnen.

Wenngleich es, wie oben beschrieben, bei der Herstellung von Brauwürze durch enzymatische Behandlung von Gerste zunächst darauf ankommt, daß die scheinbaren Vergärungsgrade der Würze aus Gerste und Enzymen und der herkömmlichen Würze aus Malz vergleichbar sind, ist es ebenso wichtig, daß die Zusammensetzung hinsichtlich von Stickstoffverbindungen der Würze aus Gerste und Enzymen und derjenigen aus Malz vergleichbar ist. Hinsichtlich der Stickstoffverbindungen, die zusammen mit den Kohlenhydraten wichtige Bestandteile darstellen, ist es erforderlich, daß hinreichende Menge von Aminosäuren erzeugt und auch Peptide in geeigneter Konzentration zurückgehalten werden.

Niedriger molekulare Stickstoffverbindungen, wie Aminosäuren, sind als die Hauptnahrungsquellen für die Bierhefe von Bedeutung. Wenn diese Stickstoffverbindungen fehlen, erfolgt die Vergärung der Würze nicht normal, so daß die Ausgewogenheit der Geschmackseigenschaften des erhaltenen Biers nicht zufriedenstellend ist. Höher molekulare Stickstoffverbindungen sind einerseits für die kolloidalen Eigenschaften sowie andererseits für das volle Aroma des Biers von Bedeutung. Dementsprechend ist es bei

2755067

der Herstellung von Brauwürze ein weiteres Erfordernis zur Erzeugung von Bier mit ausgezeichneten Geschmackseigenschaften, den Gehalt an niedrigermolekularen und höhermolekularen Stickstoffverbindungen auf einen Wert in einem erwünschten Bereich einzustellen.

Bei den bisherigen Verfahren zur enzymatischen Behandlung von Gerste führt jedoch der vollständige Ersatz des Malzes durch Gerste und äußere Enzyme zu einer Zusammensetzung der erhaltenen Würze hinsichtlich von Stickstoffverbindungen, die sich von derjenigen der herkömmlichen Würze aus Mals unterscheidet. Bei der herkömmlichen Würze aus Malz beträgt das Verhältnis von Formolstickstoff, der für die Menge an niedrigermolekularen Stickstoffverbindungen kennzeichnend ist, zu Gesamtstickstoff etwa 1:3, während für die Würze, die durch vollständigen Ersatz des Malzes durch Gerste und ein äußeres Enzym hergestellt wurde, dieses Verhältnis etwa 1:4 beträgt (vgl. Inst. Brew. Australia and New Zealand Sec. 111(1966)).

Bei der enzymatischen Behandlung von Gerste sind die niedrigermolekularen Stickstoffverbindungen in der Würze im allgemeinen in geringerem Maße vorhanden als bei der herkömmlichen Würze (vgl. Eur. Brew. Conv. Proc. Congr. 283(1967)), und selbst wenn die enzymatische Behandlung in Kombination mit etwa 20% Malz durchgeführt wird, bleibt dieser Sachverhalt unverändert (vgl. US-PS 3 713 840, Brewers' Digest 56 (1969) und Process Biochemistry 46 (1970)). Daher wird bei der enzymatischen Behandlung von Gerste, wenn man versucht, den Gehalt an Gesamtstickstoff der Würze an denjenigen von herkömmlicher Würze aus Malz anzupassen, die Menge der niedrigermolekularen Stickstoffverbindungen, die als Nahrungsquelle für die Bierhefe dienen, unzureichend.

809843/0571

2755067

Wenn andererseits versucht wird, den Gehalt an niedrigermolekularen Stickstoffverbindungen an denjenigen der herkömmlichen Würze aus Malz anzupassen, wird die Menge an Gesamtstickstoff außerordentlich hoch. Es ist äußerst schwierig, ein Bier mit ausgezeichneten Geschmackseigenschaften aus diesen Würzen zu brauen, wenn deren Zusammensetzung an Stickstoffverbindungen von derjenigen herkömmlicher Würze verschieden ist.

Es wurde nun gefunden, daß Microorganismen, die der Gattung Streptomyces angehören, eine Amylase erzeugen, die eine bestimmte enzymatische Aktivität besitzt, wie in JA-AS 1871/74, US-PS 3 804 717, GB-PS 1 377 223, KA-PS 973 492 und FR-PS 2 110 070 beschrieben. Diese Amylase ist hitzestabil und besitzt eine große Fähigkeit zur Erzeugung von Maltose sowie Verflüssigungsaktivität. Wenn jedoch diese Amylase unmittelbar auf rohe Gerste einwirkengelassen wird, so werden der scheinbare Vergärungswert und die Zusammensetzung der Stickstoffverbindungen der erhaltenen Würze nicht vergleichbar mit den entsprechenden Eigenschaften der von Malz stammenden Würze.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Erzeugung von Brauwürze anzugeben, bei dem ungemälzte Gerste mit einer von einem Microorganismus der Gattung Streptomyces erzeugten Amylase behandelt wird, bei dem danach durch enzymatische Behandlung von Gerste eine Würze erzeugt wird, die solche hinreichenden Mengen an vergärbaren Zuckern sowie eine derartige Zusammensetzung der Stickstoffverbindungen aufweist, wie sie den entsprechenden Werten von herkömmlicher Würze aus Malz vergleichbar sind.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Brauwürze durch enzymatische Behandlung eines stärkehaltigen Materials, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

809843/0571

(1) ein stärkehaltiges Material, das Gerste als einen Hauptbestandteil enthält und das einer Gelatinierungsbehandlung unterworfen worden ist, bereitstellt, und

(2) auf das stärkehaltige Material zu seiner Verzuckerung eine Amylase einwirken läßt, die durch aerobe Züchtung eines der Gattung *Streptomyces* angehörenden Amylase erzeugenden Microorganismus hergestellt wurde und die bei Verwendung von Stärke derartige enzymatische Aktivitäten und Eigenschaften besitzt, daß ihr optimaler pH-Wert im Bereich von 4,5 bis 5,0 liegt, die Grenze für die Stärkehydrolyse nicht unter 75% der theoretischen Maltose liegt und das Verhältnis von Glucose zu Maltose, die aus der Stärke gebildet werden, nicht über 0,06 : 1, bezogen auf das Gewicht, beträgt.

Diese Amylase wird im folgenden als *Streptomyces*-Amylase bezeichnet.

Eine Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht somit im wesentlichen darin, daß eine spezielle Amylase, d.h. die *Streptomyces*-Amylase, sowie als Substrat, auf das das Enzym einwirkt, gelatiniertes stärkehaltiges Material mit Gerste als einem Hauptbestandteil eingesetzt werden. Diese beiden Erfordernisse wirken miteinander darauf hin, daß eine Brauwürze erzeugt wird, die eine Zusammensetzung ähnlich derjenigen von herkömmlicher Würze aus Malz besitzt. Insbesondere wird bei Verwendung der *Streptomyces*-Amylase mit Leichtigkeit eine Würze erhalten, die den sehr hohen scheinbaren Vergärungsgrad von beispielsweise 87% aufweist, wie weiter unten in Beispiel 7 dargelegt.

Diese Eigenschaft der *Streptomyces*-Amylase kann als einzigartig angesehen werden, weil, wie oben erwähnt, die Gelatinierung von Gerste die Inaktivierung der β -Amylase in den Gerstenkörnern bewirkt, die im Falle der Verwendung

anderer Enzyme als Streptomyces-Amylase zu einer Abnahme des scheinbaren Vergärungsgrades führt, wie ebenfalls weiter unten in Beispiel 7 gezeigt. Außerdem führt die Gelatinierungsbehandlung zu einer Verbesserung des Geschmacks des erhaltenen Biers, wie weiter unten in den Beispielen 1 bis 4 gezeigt wird. Daher wird es durch die vorliegende Erfindung ermöglicht, lediglich durch Behandlung von Gerste mit der Streptomyces-Amylase ohne Malzzusatz eine geeignete Brauwürze zu erzeugen.

Gemäß einer weiteren Durchführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Brauwürze durch enzymatische Behandlung eines stärkehaltigen Materials die folgenden Stufen:

- (1) Bereitstellung eines stärkehaltigen Materials, das Gerste als einen Hauptbestandteil enthält, und
- (2) Einwirkenlassen einer Amylase und einer Protease auf das stärkehaltige Material zu seinem Abbau, wobei die Amylase durch aerobe Züchtung eines der Gattung Streptomyces angehörenden Amylase erzeugenden Microorganismus hergestellt wird und bei Verwendung von Stärke derartige enzymatische Aktivitäten und Eigenschaften aufweist, daß ihr optimaler pH-Wert im Bereich von 4,5 bis 5,0 liegt, die Grenze bei der Hydrolyse der Stärke nicht unter 75% der theoretischen Maltose liegt sowie das Verhältnis von Glucose zu Maltose, die aus der Stärke gebildet werden, nicht über 0,06:1, bezogen auf das Gewicht, beträgt, und wobei die Protease von einem der Gattung Aspergillus angehörenden Microorganismus erzeugt wird.

Die Amylase wird wiederum als Streptomyces-Amylase und die Protease als Aspergillus-Protease bezeichnet.

Wie oben beschrieben, erhält man, wenn man eine bestimmte Amylase, nämlich die Streptomyces-Amylase, auf gelatinierte Gerstenstärke einwirken läßt, eine Würze mit

einem scheinbaren Vergärungsgrad, der demjenigen herkömmlicher Würze aus Malz gleichkommt, ohne die Verwendung von Malz. Wenn jedoch die enzymatische Behandlung von Gerste durch die Streptomyces-Amylase unter gleichzeitiger Einwirkung einer bestimmten Protease, nämlich der Aspergillus-Protease, gemäß der zweiten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ausgeführt wird, so erhält man eine Würze, die nicht nur hinsichtlich der Zusammensetzung der Kohlenhydrate mit der herkömmlichen Würze aus Malz vergleichbar ist, sondern auch hinsichtlich der Zusammensetzung der Stickstoffverbindungen. D.h., daß das Verhältnis von Formolstickstoff zu Gesamtstickstoff von 1:3, das bei der herkömmlichen Würze aus Malz auftritt, leicht erreicht wird und daß auf diese Weise in dem erhaltenen Bier der ausgezeichnete Geschmack mit demjenigen von Bier, das aus herkömmlicher Würze aus Malz hergestellt worden ist, vergleichbar ist.

Außerdem werden bei Verwendung der Aspergillus-Protease während der enzymatischen Behandlung von Gerste durch die Streptomyces-Amylase auch dann ein hoher scheinbarer Vergärungsgrad sowie ein großes Verhältnis von Formolstickstoff zu Gesamtstickstoff erzielt, die beide den entsprechenden Werten der herkömmlichen Würze vergleichbar sind, wenn die Gerstenstärke vorher nicht gelatiniert worden ist.

Die Wirkung der Kombination zwischen der bestimmten Amylase und der bestimmten Protease führt nur in bestimmten Fällen zu den nach der zweiten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erzielten Vorteilen. D.h., mit anderen Amylasen als der Streptomyces-Amylase wird ein nichtzufriedenstellender scheinbarer Vergärungsgrad erzielt, während mit Bakterien-Proteasen ein Verhältnis von Formolstickstoff zu Gesamtstickstoff erzielt wird, das mit demjenigen von herkömmlicher Würze aus Malz nicht vergleichbar ist.

2755067

Die beschriebenen Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind unerwartet. Es war zwar bekannt, daß Proteasen, die von Bakterien erzeugt werden, die beispielsweise der Gattung *Bacillus* angehören, zur Verwendung bei der enzymatischen Behandlung von Gerste am besten geeignet sind. (vgl. GB-PSn 1 202 976, 1 304 005 und 1 303 644 und US-PS 3 719 500). Auch ist aus diesen und anderen Literaturstellen (*Prikladnaya Biochimiya i Mikrobiologia* XII (6), 897 (1976)) bekannt, daß von Pilzen, wie beispielsweise *Aspergillus*, hergestellte Proteasen in Kombination mit einer Amylase eingesetzt werden können. Jedoch war nicht vorauszusehen, daß eine Kombination einer bestimmten Amylase, d.h. der *Streptomyces*-Amylase und einer bestimmten Protease, d.h. der *Aspergillus*-Protease, zu einer einzigartigen Wirkung führt, d.h. zur gleichzeitigen Erfüllung der Bedingungen, die an die Zusammensetzung der Würze im Hinblick auf Kohlenhydrate und Stickstoffverbindungen gestellt werden, ohne daß zusätzlich Malz verwendet werden muß.

Ein weiteres unerwartetes Merkmal besteht darin, daß gemäß der zweiten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die Gelatinierung der Gerste nicht erforderlich ist, um eine hinreichende Menge an vergärungsfähigen Zuckern in der Würze zu erzielen, wenngleich gemäß der ersten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die Gerste vorher gelatiniert werden muß.

Die oben beschriebene zweite Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist für großtechnische Zwecke höchst vorteilhaft, da man mit ihr eine Brauwürze erzeugen kann, die hinsichtlich ihrer Zusammensetzung an sowohl Kohlenhydraten als auch Stickstoffverbindungen mit herkömmlicher Würze aus Malz vergleichbar ist, ohne daß die Gerstenstärke vorher gelatiniert werden mußte.

809843/0571

2755067

- (5) *Streptomyces viridochromogenes*
(FERM - Nr. P603, ATCC Nr. 21724)
Dieser Stamm ist in Waksman: "The Actinomycetes", Band 2 (1961) und "Journal of Bacteriology", Band 85, Seiten 676-690 (1963) beschrieben. Es handelt sich um einen der bevorzugten Stämme, die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendbar sind.
- (6) *Streptomyces albus*
(FERM - Nr. P604, ATCC Nr. 21725)
Dieser Stamm ist in Waksman: "The Actinomycetes", Band 2 (1961) beschrieben und ist einer der bevorzugten Stämme, die sich für die Zwecke der vorliegenden Erfindung eignen.
- (7) *Streptomyces tosaensis nov.sp.*
(FERM - Nr. P601, ATCC Nr. 21723)
Dieser Stamm wurde von einigen Erfindern des vorliegenden Verfahrens isoliert; Einzelheiten sind u.a. in der oben erwähnten JA-AS 1871/74 erwähnt. Der Stamm ist einer der bevorzugten Stämme, die sich für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eignen.

- * Die FERM-Nummer ist eine Hinterlegungsnummer beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology of the Ministry of International Trade and Industry, Japan, Inage, Chiba-Shi, Japan.
- ** ATCC = American Type Culture Collection, ^{Rockville} Maryland, USA.

Die Züchtung dieser Stämme unter aeroben Bedingungen und die Gewinnung und Reinigung der gebildeten und im Kulturmedium angesammelten Amylase kann nach herkömmlichen Verfahren durchgeführt werden, wie sie beispielsweise für Actinomyceten angewandt werden, wie beispielsweise u.a. in der oben erwähnten JA-AS 1871/74 erwähnt. Beispielsweise wird *Streptomyces hygroscopicus* (ATCC Nr. 21722) auf ein

2755067

Im folgenden werden die einzelnen Merkmale des erfindungsgemäßen Verfahrens im einzelnen beschrieben.

Streptomyces-Amylase

Die Streptomyces-Amylase, die man auf die stärkehaltigen Materialien bei dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung einwirken läßt, besitzt eine derartige enzymatische Aktivität und derartige Eigenschaften, daß ihr optimaler pH-Wert im Bereich von 4,5 bis 5,0 liegt, die Grenze bei der Hydrolyse von Stärke nicht unter 75% der theoretischen Maltose liegt und das Verhältnis von Glucose zu Maltose, die aus der Stärke gebildet werden, nicht über 0,06:1, bezogen auf das Gewicht, beträgt. Die Streptomyces-Amylase wird durch aerobe Züchtung eines der Gattung Streptomyces angehörenden Amylase erzeugenden Microorganismus erzeugt (vgl. JA-AS 1871/74, US-PS 3 804 717, GB-PS 1 377 223, KA-PS 973 492 und FR-PS 2 110 070).

Beispiele für Stämme für derartige Amylase erzeugende Streptomyces-Arten sind:

- (1) Streptomyces aureofaciens
(FERM* - Nr. P606)
- (2) Streptomyces flavus
(FERM - Nr. P605)
- (3) Streptomyces hygroscopicus var. angustomyceticus
(FERM - Nr. P607)
- (4) Streptomyces hygroscopicus
(FERM - Nr. P602, ATCC** Nr. 21722)
Dieser Stamm ist in Waksman: "The Actinomycetes", Band 2 (1961) und "Applied Microbiology", Band 10, Seiten 258-263 (1962) beschrieben. Es handelt sich um einen der bevorzugten Stämme, die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendbar sind.

809843/0571

2755067

Impfmedium geimpft, das 2% Maismehl, 1% Weizenkeime und 0,5% Ferma-Medium der Trader's Oil Mill Co., Texas, USA enthielt und einen pH-Wert von 7,0 aufwies, sowie zur Erzeugung der Impfkultur 24 h bei 28 °C gehalten wurde.

Mit der Impfkultur wurde dann ein Kulturmedium beimpft, das 12% lösliche Stärke, 3% Sojabohnenkuchen und 0,2% Kaliumdihydrogenphosphat enthielt und einen pH-Wert von 7,0 aufwies. Es wurde 90 h bei 35 °C kultiviert. Die erhaltene Kulturbrühe wurde filtriert und das Filtrat auf etwa 1/5 seines ursprünglichen Volumens konzentriert. Danach wurde die konzentrierte Lösung mit der zweifachen Menge kaltem Ethanol versetzt, um die Amylase auszufällen. Die ausgefällte Amylase wurde getrocknet, so daß man das Rohenzym erhielt.

Aspergillus-Protease

Die Protease, die man gemäß der zweiten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auf das stärkehaltige Material einwirken läßt, wird von einem Microorganismus erzeugt, der der Gattung *Aspergillus* angehört. Beispiele für *Aspergillus*-Arten, die eine derartige Protease herstellen sind *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus oryzae* 08.1 (FERM 3745; ATCC Nr. 20498), der früher von den Erfindern des vorliegenden Verfahrens isoliert wurde. Außer den Proteasen, die durch Züchtung dieser Pilze erhalten werden, können auch einige im Handel erhältliche Proteasen verwendet werden. Beispiele für diese im Handel erhältlichen Proteasen, die von *Aspergillus*-Arten erzeugt werden, sind "Protease AmanoA" der Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Japan, "Denazym" der Nagase Co., Ltd., Japan, "Rhoszyme A 4" von Rohm und Haas, Penn., USA und "Fermex" von Watterstein, N.Y., USA. Die gemeinsamen Eigenschaften dieser Proteasen sind ein optimaler pH-Wert von 6,5 bis 7,5, eine optimale Temperatur von

809843/0571

45 bis 55 °C und ein stabiler pH-Bereich von 5,5 bis 10,0.

Ein wichtiges Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Mitverwendung von Malz entbehrlich gemacht wird, indem man die gelatinierte Gerste mit der Streptomyces-Amylase oder mit dieser in Kombination mit Aspergillus-Protease behandelt. Nötigenfalls kann jedoch auch zusammen mit diesen Materialien Malz zugesetzt werden. Anstelle der Mitverwendung von Malz selbst kann auch eine geringe Menge an aus Malz extrahierter Diastase oder es können andere Amylasen, Proteasen, Cellulasen, Glucanasen und dgl. zusammen mit der Streptomyces-Amylase und ggf. Aspergillus-Protease mitverwendet werden.

Stärkehaltige Materialien

Das stärkehaltige Material, das mit der Streptomyces-Amylase allein oder zusammen mit Aspergillus-Protease behandelt wird, enthält Gerste als einen Hauptbestandteil. Darunter ist zu verstehen, daß das stärkehaltige Material außer Gerste 0 bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Gerste, an einem anderen stärkehaltigen Material, wie Stärke, Reis, chinesischem Zuckerrohr und Kartoffeln, insbesondere aber Stärke aus ungekeimtem Getreide, enthalten kann.

In den Fällen, in denen die Streptomyces-Amylase in Kombination mit der Aspergillus-Protease gemäß der zweiten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet wird, braucht die Gerstenstärke nicht vorher gelatiniert zu werden. Bei der ersten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der keine Aspergillus-Protease zusätzlich zu der Streptomyces-Amylase verwendet wird, ist die Gelatinierung der Gerstenstärke jedoch von großer Bedeutung. In den Fällen, in denen zusätzliches stärkehaltiges Material außer Gerste verwendet wird, kann das zusätzliche stärkehaltige Material vorher gelatiniert oder nicht gelatiniert sein. Wenn das zusätzliche stärke-

haltige Material gelatinisiert ist, so kann seine Gelatinierung zugleich mit oder getrennt von der Gelatinierung der Gerste durchgeführt werden.

Die Gelatinierung bei dem Verfahren gemäß der Erfindung kann nach jedem Verfahren durchgeführt werden, das sich zur Gelatinierung von stärkehaltigen Materialien eignet. Beispielsweise kann die Gerste in Körner- oder Schrotform gekocht werden. Das Kochen besteht im Erhitzen der Gerste mit mindestens der halben Gewichtsmenge Wasser unter Druck bei mindestens 100 und vorzugsweise 110 bis 130 °C während mindestens 20 und vorzugsweise während 30 bis 60 min. Das Kochen kann auch durch Dämpfen durchgeführt werden.

Ein weiteres Beispiel für die Gelatinierung ist eine Behandlung mit einem Extruder bei erhöhter Temperatur und erhöhtem Druck. Der Extruder enthält als Hauptteile eine Heizvorrichtung zum Erhitzen und Plastifizieren des zu behandelnden Materials sowie eine Schnecke zum Vorwärtsbewegen des plastifizierten Materials unter Druck (vgl. Ind. Eng.-Chem. 45, 970 (1953)). Gerste in Korn- oder Schrotform wird in einem Extruder bei erhöhter Temperatur und erhöhtem Druck gelatinisiert. Das zusätzliche stärkehaltige Material, das nicht über 80 Gew.-% des Gerstengewichts ausmacht, kann ebenfalls mit der Gerste gelatinisiert werden.

Nach der Gelatinierung wird die Gerste im feuchten Zustand oder nach Trocknen, beispielsweise auf einen Feuchtigkeitsgehalt von nicht über 5 Gew.-%, der enzymatischen Behandlung gemäß der Erfindung unterworfen.

Das stärkehaltige Material, das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet wird, kann außer der Gelatinierung verschiedenen anderen Behandlungen, insbesondere enzymatischen Behandlungen unterworfen worden sein. Beispielsweise kann die enzymatische Behandlung mit α -Amylase, Cel-

lulase oder Protease gleichzeitig mit, vor oder nach der Gelatinierung durchgeführt werden. Gemäß einem Beispiel der vorliegenden Erfindung wird ein stärkehaltiges Material in Gegenwart von α -Amylase gekocht, um so zugleich gelatinisiert und verflüssigt zu werden. Insbesondere werden Gerste und 0 bis 80%, bezogen auf die Gerste, an einem zusätzlichen stärkehaltigen Material zu der zwei- bis vierfachen Menge, bezogen auf das feste Gemisch, an Wasser hinzugegeben, um so eine Aufschlammung herzustellen. Danach wird diese Aufschlammung mit 0,1 bis 0,3% der Gesamtmenge des stärkehaltigen Materials (Trockengewicht) an α -Amylase versetzt und das Ganze zur Verflüssigung der Stärke 5 bis 30 min auf 70 bis 90 °C erhitzt. Danach wird die Aufschlammung 5 bis 30 min bei 100 bis 120 °C gekocht, um die Verflüssigung der Stärke zu vervollständigen.

Maischen (enzymatische Behandlung des stärkehaltigen Materials)

Um die Streptomyces-Amylase ggf. zusammen mit der Aspergillus-Protease auf das auf diese Weise vorbehandelte stärkehaltige Material einwirkenzulassen, kann man jedes Maischverfahren, das beim herkömmlichen Brauen mit Gersten-enzymen üblich ist, oder ein anderes geeignetes Verfahren anwenden.

Ein Beispiel für ein derartiges Verfahren ist das Infusionsverfahren, bei dem die gesamte Aufschlammung in Gegenwart eines Enzyms in einem einzigen Maischbottich ohne Aufteilung der Aufschlammung erhitzt wird. In diesem Fall wird das Erhitzen derart ausgeführt, daß man damit bei der niedrigsten Temperatur beginnt und dann die Temperatur allmählich erhöht, oder daß man bei der höchsten Temperatur beginnt und die Temperatur allmählich senkt.

Auch kann das Dekoktionsverfahren angewandt werden. Dieses Verfahren wird derart durchgeführt, daß die Auf-

schlammung in Gegenwart eines Enzyms in einem Maischbottich erhitzt wird, wobei jedoch ein Teil der Aufschlammung abgezogen und in einer Maischpfanne gekocht wird. Die Aufschlammung in der Maischpfanne wird danach in den Maischbottich zurückgeführt, so daß die Temperatur der gesamten Aufschlammung erhöht wird.

Im einzelnen wird beispielsweise die Streptomyces-Amylase in einer Menge von 1 bis 8 mg/g Gerste dem Gemisch aus heißem Wasser und stärkehaltigem Material zugesetzt, das erforderlichenfalls in der oben beschriebenen Weise zuvor gelatinisiert und verflüssigt worden ist; erforderlichenfalls werden ferner 0,5 bis 5,0 mg Aspergillus-Protease je g Gerste oder 1 bis 4 mg Papain je g Gerste als proteolytisches Enzym und 1 bis 4 mg Cellulase je g Gerste der Aufschlammung zugesetzt. Die erhaltene Aufschlammung wird 30 bis 90 min bei 45 bis 55 °C gehalten, danach auf eine Temperatur von 60 bis 65 °C gebracht und bei dieser Temperatur 30 bis 60 min gehalten. Ein Teil der Aufschlammung (etwa 1/3 bis die Hälfte) wird abgezogen und in einer Maischpfanne 5 bis 10 min gekocht und danach in den Maischbottich zurückgeführt. Während dieses Verfahrensschrittes wird die in dem Maischbottich zurückbleibende Aufschlammung bei einer Temperatur von 60 bis 65 °C gehalten. Auf diese Weise kann eine Brauwürze erzeugt werden, die sich zum Brauen von Bier mit guten Geschmackseigenschaften eignet. Die beschriebene Kochstufe kann zweimal durchgeführt werden. Beispielsweise wird nach der obigen Behandlung die vereinigte Aufschlammung auf eine Temperatur von 70 bis 75 °C erhitzt und danach erneut ein Drittel bis die Hälfte der Aufschlammung abgezogen, um 5 bis 10 min gekocht zu werden. Die zurückbleibende Aufschlammung wird 20 bis 40 min bei 70 bis 75 °C gehalten und danach mit der gekochten Aufschlammung vereinigt.

Vorzugsweise wird das zusätzliche stärkehaltige Material außer der Gerste zusammen mit der Gerste, die gelatiniert werden kann, mit der Streptomyces-Amylase behandelt. Jedoch braucht in diesem Falle das zusätzliche stärkehaltige Material nicht vom Anfang des für die Gerste durchgeführten Maischverfahrens an anwesend zu sein. Gewünschtenfalls kann das zusätzliche stärkehaltige Material vorher von α -Amylase und bzw. oder Cellulase aufgeschlossen und danach für das für die Gerste durchgeführte Maischverfahren eingeführt werden.

Die auf diese Weise erzeugte Maische wird filtriert und der Extraktgehalt des Filtrats (süße Würze) auf den gewünschten Wert von beispielsweise 10 bis 12 °Plato gebracht. Danach wird eine geeignete Menge, wie beispielsweise 2 bis 5 g/l Hopfen zu der süßen Würze zugesetzt und das Ganze 1 bis 2 h gekocht. Danach wird die erhaltene gehopfte Würze mit Hilfe von Bierhefe der Gärung unterworfen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie zu beschränken.

Beispiel 1

Rohgerste wurde unter Druck mit der gleichen Gewichtsmenge Wasser bei einer Temperatur von 120 °C 30 min lang gekocht. Danach wurde die gekochte Gerste in Heißluft von 85 °C 6 h lang getrocknet, wonach man gelatinierte Gerste erhielt.

Nach dem Vermahlen der erhaltenen gelatinierten Gerste wurden 9 kg davon in einen Maischbottich eingebracht, in den außerdem 30 l heißes Wasser von 50 °C, 20 g Streptomyces-Amylase, 10 g Papain und 10 g Cellulase eingebracht wurden. Die Aufschlammung wurde 60 min lang bei 50 °C gerührt.

Unabhängig davon wurden 3,5 kg Maisstärke, 15 l heißes Wasser von 50 °C und 10 g α -Amylase in einen Kocher eingebracht. Der Inhalt des Kochers wurde innerhalb 10 min auf 70 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 10 min lang gehalten. Danach wurde die Temperatur des Inhalts innerhalb 15 min auf 100 °C erhöht und der Inhalt 25 min lang gekocht. Während dieser Zeit erfolgte die Verflüssigung der Maisstärke.

Nach Vervollständigung dieser Verfahren wurden beide Aufschlammungen vereinigt und die erhaltene Aufschlammung auf 65 °C erhitzt und 30 min bei dieser Temperatur gehalten. Danach wurden etwa 50% der Aufschlammung in eine Maischpfanne überführt und gekocht. Die verbleibende Aufschlammung wurde bei einer Temperatur von 65 °C ^{10 min} im Maischbottich gehalten. Während dieser Verfahrensstufe erfolgte hauptsächlich die Bildung von vergärungsfähigen Zuckern.

Nach dem Ende des Maischens wurden die Aufschlammungen aus Maischbottich und Maischpfanne vereinigt und auf eine Temperatur von 80 °C gebracht. Danach wurde die Aufschlammung gefiltert und der erhaltene Kuchen mit heißem Wasser begossen. Nachdem man den Extraktgehalt der erhaltenen süßen Würze eingestellt hatte, wurde die Würze mit Hopfen gekocht. Die erhaltene gehopfte Würze wurde gekühlt und mit Bierhefe der Gärung unterworfen. Gärung, Lagern, Filtrieren und Abfüllen des fertigen Biers in Flaschen wurden auf herkömmliche Weise durchgeführt.

Beispiel 2

9 kg gemahlene Gerste, 3,5 kg Maisstärke, 10 g α -Amylase und 5 g Cellulase wurden zu 50 l heißem Wasser von 50 °C hinzugegeben und die erhaltene Aufschlammung 30 min bei 50 °C gehalten, danach innerhalb 10 min auf 90 °C erhitzt und 10 min bei dieser Temperatur gehalten und schließlich 30 min gekocht. Die Aufschlammung wurde

auf 50 °C gekühlt und mit 20 g Streptomyces-Amylase, 10 g Papain und 10 g Cellulase versetzt. Danach wurde die Aufschlammung 30 min bei 50 °C gehalten und anschließend auf 65 °C erhitzt.

Danach erfolgte das weitere Verfahren nach der in Beispiel 1 beschriebenen Weise.

Beispiel 3

Beispiel 1 wurde mit der Abweichung wiederholt, daß beim Zusatz der Streptomyces-Amylase und der anderen Enzyme 5 g Diastase als Hilfsenzym für die Streptomyces-Amylase verwendet wurden.

Beispiel 4

Beispiel 2 wurde mit der Abweichung wiederholt, daß beim Zusatz der Streptomyces-Amylase und der anderen Enzyme 5 g Diastase als Hilfsenzym für die Streptomyces-Amylase verwendet wurden.

Beispiel 5

Rohgerste wurde grob gemahlen und in einem Extruder gelatiniert. Die gelatinierte Gerste wurde mit ~~einem~~ Enzymen gemäß der in Beispiel 1 angegebenen Vorschrift behandelt.

Beispiel 6

Rohgerste und Maisschrot wurden jeweils in einem Extruder gelatiniert. 9 kg der gelatinierten Gerste und 3,5 kg des gelatinierten Maisschrotes wurden in einen Maischbottich eingebracht und mit 50 l heißem Wasser von 50 °C und den in Beispiel 1 angegebenen Enzymen versetzt. Die erhaltene Aufschlammung wurde 60 min bei 50 °C gehalten und anschließend auf 65 °C erhitzt.

Danach wurde die Aufschlammung nach der in Beispiel 1 angegebenen Vorschrift behandelt. Die Zusammensetzung der Würzen, die gemäß den Beispielen 1 bis 4 erhalten wurden, sind in der folgenden Tabelle I zusammengestellt.

Die in Tabelle I angegebene Kohlenhydratzusammensetzung wurde mit Hilfe der Gelfiltration (Am. Soc. Brew. Chem. Proc. 154, 1970) bestimmt, während die anderen Mengenangaben nach der EBC-Methode (Analytica EBC 3. Auflage 1975) ermittelt wurden.

Tabelle I

Zusammensetzung * der Würze

Würze	Beispiel 1	Beispiel 2	Beispiel 3	Beispiel 4	Vergleichs- versuch **
Scheinbarer Vergärungswert, %	84,4	83,2	86,5	85,1	83,2 - 86,7
Monosaccharide, %	8,5	8,3	9,3	9,0	8,4 - 10,5
Disaccharide, %	49,2	49,1	50,8	51,0	49,8 - 51,9
Trisaccharide, %	17,3	16,8	16,2	15,9	15,2 - 16,7
Vergärungsfähige Zucker, %	75,0	74,2	76,3	75,9	73,4 - 78,5
Oligosaccharide, %	9,3	9,3	9,1	8,7	8,6 - 10,5
Dextrin, %	15,7	16,5	14,6	15,4	12,9 - 16,1
Gesamtstickstoff, mgN/100 ml	80,2	81,0	83,3	84,6	76,2 - 84,7

* Die Werte sind als Werte für eine Würze von 11 °P angegeben.

** Anstelle von Gerste und ~~das~~ ^{zu} Enzymegemäß Beispiel 1 wurden fünf Malzarten verwendet.

2755067

809843/0571

Wie sich aus Tabelle I ergibt, eignet sich die Zusammensetzung der erhaltenen Würze im Hinblick auf die Kohlenhydrate zum Bierbrauen, wenn gelatinierte Gerste mit der Streptomyces-Amylase gemäß Beispielen 1 und 2 behandelt wird.

Der Geschmack des aus der Würze, die nach der ersten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erhalten worden ist, gebrauten Bieres wurde mit demjenigen eines Vergleichsbieres in einem Geschmackstest verglichen (Dreieckstest; triangular test), das aus Malz hergestellt worden war. Eine Jury aus 20 Geschmacksprüfern stellte keinen entscheidenden Unterschied zwischen dem Bier fest, das aus der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Würze gebraut worden war und dem Vergleichsbier fest. Außerdem besaß das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene Bier einen malzigen Geschmack und ein Bieraroma und war frei von dem Geruch nach Treber und Diacetyl. Das Bier, das aus der Würze gebraut worden war, die durch herkömmliche enzymatische Behandlung von Gerste erhalten worden war, besaß diese guten Geschmackseigenschaften kaum.

Beispiel 7

Gerste oder gelatinierte Gerste wurde mit einem Enzym in einer Menge, die der verzuckernden Aktivität von Malz entsprach, unter den in Beispiel 1 angegebenen Temperaturbedingungen behandelt. Der scheinbare Vergärungsgrad der erhaltenen Würzen ist in Tabelle II angegeben.

Tabelle II

Scheinbarer Vergärungsgrad von Würze (%)

Enzym Material	Strepto- myces- Amylase	Handels- produkt A	Handels- produkt B	Malz * (Vergleich)
Gerste und Maisstärke	76	80	72	-
Gelatinierte Gerste und Maisstärke	87	73	53	-
Malz und Maisstärke (Vergleich)	-	-	-	82 - 87

* Anstelle von Gerste und den in Beispiel 1 beschriebenen verschiedenen Enzymen wurden fünf Malzarten verwendet.

Aus Tabelle II geht hervor, daß beim Behandeln von gelatinierter Gerste mit Streptomyces-Amylase als Hauptenzymquelle der scheinbare Vergärungsgrad der erhaltenen Würze vergleichbar demjenigen der Vergleichswürze ist und diese Wirkung nicht mit anderen Enzymen erzielt werden kann.

Beispiel 8

In einen Maischbottich wurden 9 kg gemahlene Gerste zusammen mit 30 l heißem Wasser von 50 °C, 15 g Aspergillus-Protease, 20 g Streptomyces-Amylase und 10 g Cellulase eingebracht. Die erhaltene Aufschlammung wurde 60 min bei 50 °C gerührt, um die hauptsächliche Bildung von Stickstoffverbindungen stattfindenzulassen.

Getrennt davon wurden 3,5 kg Maisstärke, 15 l heißes Wasser von 50 °C und 10 g α -Amylase in einen Kocher eingebracht. Der Inhalt des Kochers wurde 10 min auf 70 °C erhitzt und weitere 10 min bei dieser Temperatur gehalten.

2755067

Danach wurde die Aufschlammung innerhalb von 15 min auf 100 °C erhitzt und 25 min gekocht. Während dieses Verfahrens erfolgte die Verflüssigung der Maisstärke.

Nach Beendigung dieser Verfahren wurden die beiden Aufschlammungen vereinigt, auf 65 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 30 min gehalten. Danach wurden etwa 50% der Aufschlammung in eine Maischpfanne überführt und gekocht. Die zurückbleibende Aufschlammung wurde in dem Maischbottich 60 min bei 65 °C gehalten. Während dieses Verfahrens erfolgte hauptsächlich die Bildung der vergärungsfähigen Zucker.

Nach Beendigung des Maischens wurden die Aufschlammungen aus Maischbottich und Maischpfanne vereinigt, auf 80 °C erhitzt und filtriert. Nach Einstellen des Gehaltes der erhaltenen süßen Würze wurde die Würze mit Hopfen gekocht. Die erhaltene gehopfte Würze wurde gekühlt und mit Bierhefe vergoren. Gärung, Lagern, Filtrieren und Abfüllen des erhaltenen Biers in Flaschen wurden auf herkömmliche Weise durchgeführt.

Beispiel 9

9 kg gemahlene Gerste, 3,5 kg Maisstärke, 10 g α -Amylase und 5 g Cellulase wurden zu 50 l heißem Wasser von 50 °C zugesetzt. Die erhaltene Aufschlammung wurde 30 min bei 50 °C gehalten, innerhalb 10 min auf 90 °C erhitzt, 10 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend 30 min gekocht. Die erhaltene Aufschlammung wurde danach auf 50 °C gekühlt und mit 15 g Aspergillus-Protease, 20 g Streptomyces-Amylase, 10 g Cellulase und 10 g β -Glucanase versetzt. Die Aufschlammung wurde 30 min bei 50 °C gehalten und danach auf eine Temperatur von 65 °C gebracht.

Danach wurde sie behandelt, wie in Beispiel 8 beschrieben.

809843/0571

Beispiel 10

Beispiel 8 wurde mit der Abweichung wiederholt, daß anstelle von roher Gerste unter Druck in einem Extruder gelatinierte Gerste verwendet wurde.

Beispiel 11

Beispiel 8 wurde mit der Abweichung wiederholt, daß nach dem Erhitzen der Aufschlammung auf 65 °C die gesamte Aufschlammung bei dieser Temperatur 90 min lang gehalten wurde.

Die Zusammensetzung der gemäß den Beispielen 8 bis 11 erhaltenen Würzen ist in Tabelle III zusammengestellt.

Die Würze wurde jeweils nach der EBC-Methode (Analytica EBC, 3. Auflage 1975) analysiert.

Tabelle III

Zusammensetzung * der Würze

Bestandteil \ Würze	Beispiel 8	Beispiel 9	Beispiel 10	Beispiel 11	Vergleichs- Versuch **
Gesamtstickstoff (mgN/100ml)	80,8	79,8	82,1	82,5	76,2 - 84,7
Formolstickstoff (mgN/100ml)	25,6	25,7	25,5	26,7	23,9 - 27,0
Formolstickstoff/ Gesamtstickstoff (%)	31,7	32,2	31,1	32,4	30,9 - 32,7
Scheinbarer Verzögerungsgrad (%)	83,9	85,3	84,7	85,0	83,2-86,7

* Die Werte sind in Form von Werten für Würze von 11 °P angegeben.

** Anstelle von Gerste und der Enzyme gemäß Beispiel 8 wurden fünf Arten Malz verwendet.

809843/0571

2755067

Wie aus Tabelle III hervorgeht, ist bei Mitverwendung von Aspergillus-Protease bei der enzymatischen Behandlung von Gerste durch Streptomyces-Amylase das Verhältnis von Formolstickstoff zu Gesamtstickstoff in der erhaltenen Würze vergleichbar zu demjenigen der aus Malz hergestellten Würze. Außerdem geht aus Tabelle III hervor, daß gleichgültig, ob die Gerste gelatinisiert ist oder nicht, ein hoher scheinbarer Vergärungsgrad der erhaltenen Würze erhalten wird, der demjenigen von aus Malz erhaltener Würze vergleichbar ist, und daß die Mitverwendung von Aspergillus-Protease bei der enzymatischen Behandlung von Gerste durch Streptomyces-Amylase die Gelatinierung der Gerste bedeutungslos macht.

Das Aroma des aus der nach der zweiten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erhaltenen Würze gebrauten Bieres wurde mit einem Vergleichsbier, das aus Malz hergestellt war, in einem Geschmackstest (Dreieckstest; triangular test) untersucht. Eine Jury aus 20 Geschmacksprüfern stellte keinen bedeutenden Unterschied zwischen dem aus der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Würze gebrauten und dem Vergleichsbier fest. Das Bier, das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten wurde, besaß einen malzigen Geschmack und ein Bieraroma und keinen Geschmack nach Treber und Diacetyl. Diese guten Geschmackseigenschaften wurden bei dem Bier, das durch herkömmliche enzymatische Behandlung erhalten worden war, kaum gefunden.

Die Würze, die durch enzymatische Behandlung von Gerste durch Streptomyces-Amylase erhalten worden war, besaß den in der folgenden Tabelle IV angegebenen scheinbaren Vergärungsgrad.

Tabelle IV

Scheinbarer Vergärungsgrad von Würze

Material Protease			1) Vergleichs- probe
	Rohe Gerste + Maisstärke	Gelatinierte Gerste + Maisstärke	
Papain	74% 2)	84% 3)	-
Aspergillus- Protease	84% 4)	85% 5)	-
			82 - 87%

Anmerkungen:

- 1) Anstelle von Gerste und der in Beispiel 1 oder 8 angegebenen Enzyme wurden fünf Malzarten verwendet.
- 2) Anstelle von gelatinierter Gerste gemäß Beispiel 1 wurde Rohgerste verwendet.
- 3) Beispiel 1
- 4) Beispiel 8
- 5) Beispiel 10

Eine derartige Wirkung der Aspergillus-Protease in Kombination mit der Streptomyces-Amylase auf den scheinbaren Vergärungsgrad der Würze kann nicht mit anderen Proteasen, wie Papain, erhalten werden, wie sich aus der Tabelle IV ergibt.

Beispiel 12

Das Verhältnis von Formelstickstoff zu Gesamtstickstoff der Würzen, die bei Behandlung von Gerste und Mais-

2755067

stärke mit verschiedenen Proteasen in Kombination mit Streptomyces-Amylase erhalten wurden, ist in der folgenden Tabelle V angegeben. Aus Tabelle V geht hervor, daß das Verhältnis von Formolstickstoff zu Gesamtstickstoff demjenigen der Würze aus Malz nur dann vergleichbar ist, wenn die Aspergillus-Protease verwendet wurde.

Tabelle V

Verhältnis von Formolstickstoff zu Gesamtstickstoff von Würze

Protease	Formolstickstoff/Gesamtstickstoff-Verhältnis der Würze (%)
Bakterielle alkalische Protease	21
Bakterielle neutrale Protease	22
Papain	25
Bromelin	26
Pancreatin	26
Trypsin	24
Aspergillus-oryzae-Protease	32
Aspergillus-mellius-Protease	31
Aspergillus-niger-Protease	33
Würze aus Malz und Maisstärke (Vergleich)*	31 - 33

* Siehe Tabelle III

809843/0571

2755067

Rohgerste wurde mit einigen handelsüblichen Amylasen zusammen mit Aspergillus-Protease behandelt. Das Handelsprodukt A war ein Gemisch aus Brauenzymen, das bakterielle Amylase enthielt, und das Handelsprodukt B bestand aus bakterieller Amylase.

Aus der folgenden Tabelle VI ist der entscheidende Einfluß von Streptomyces-Amylase bei dem erfindungsgemäßen Verfahren auf den Wert des scheinbaren Vergärungsgrades der erhaltenen Würze ersichtlich.

Tabelle VI

Scheinbarer Vergärungsgrad von Würze

Streptomyces-Amylase *	84%
Handelsprodukt A	79
Handelsprodukt B	73
Vergleich (Malz) **	82 - 87

- X Die Streptomyces-Amylase wurde ^{durch das Produkt} ~~mit Hilfe des Produk-~~
tes A oder B gemäß Beispiel 5 hergestellt. 7 steht,
- *X Vergleiche Tabelle IV.

809843/0571